EGFR/Cen7 DNA-FISH Probe

Sonde d'énumération, bicolore

REF 22-007



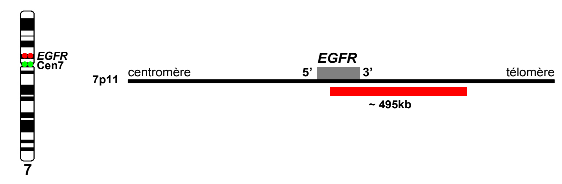


Mode d'emploi

-20ºC

Usage prévu

La sonde *EGFR* et Cen7 DNA-FISH de Cancer Genetics Italia est conçue pour détecter le nombre accru de copies du gène *EGFR* sur 7p11.2 (affecté auparavant à la bande 7p12), par rapport à la sonde témoin Cen7, par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH/Fluorescence *in situ* hybridization) sur un tissu fixé au formol et inclus paraffine (FFPE/formalinfixed paraffin-embedded). Le gène *EGFR* code une protéine transmembranaire impliquée dans la prolifération cellulaire.[1,2] Un nombre accru de copies du gène *EGFR* a été rapporté dans le cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC/non-small cell lung cancer) et dans d'autres carcinomes, y compris le cancer colorectal, celui de la tête et du cou, ainsi que du sein.[2-5] Un nombre accru de copies *EGFR* est prédictif d'une réponse à des traitements anti-EGFR.[1,3-6]



Représentation schématique de la sonde DNA-FISH *EGFR*/Cen7:
L'idéogramme du chromosome 7 illustre les sites d'hybridation de la sonde *EGFR* et Cen7 DNA-FISH. La sonde Cen7 (verte) marquée directement hybride l'ADN satellite à 7p11.1-q11. La sonde *EGFR* (rouge) marquée directement couvre la majeure partie du gène (indiqué par la barre horizontale rouge) dans le schéma ci-dessus (approximativement à l'échelle, NCBI Build 36.1/Hg18/2006).

Conservation

À l'arrivée, conserver le produit à - 20°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à la date de péremption.
Conservation des lames : Conserver les lames hybridées a -20ºC, à l'abri de la lumière.

Remarque: Ces conditions de conservation s'appliquent à la fois aux produits non ouverts et ouverts. Le nombre de cycles de gel-dégel ne doit pas dépasser le nombre de tests recommandés par flacon. Conserver dans le flacon d'origine. Les flacons conservés dans d'autres conditions peuvent ne pas offrir de performance optimale et par conséquent affecter les résultats du test.

Manipulation

» Tous les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Après usage, tout le matériel doit être éliminé conformément à la loi nationale en vigueur.
» Manipuler tous les réactifs et lames contenant des fluorophores en éclairage réduit, afin d'éviter toute détérioration du signal fluorescent.

Avertissements et mises en garde

Lire le mode d'emploi avant toute utilisation.

» Tout transport ou conservation impropre peut détruire ou détériorer la performance du produit.
» En cas de réception d'emballage ou de flacon endommagé, de défaillance du dispositif (après utilisation conforme au mode d'emploi) ou de blessure de l'utilisateur, contacter le fabricant.
» Tout flacon endommagé doit être éliminé conformément à la loi nationale en vigueur et aucun essai ne doit être réalisé à partir d'un tel réactif.
» Manipuler tous les réactifs avec soin et porter un équipement de protection individuelle approprié.
» Le formamide, la solution saline de citrate de sodium (SSC/Saline-Sodium Citrate) et le dodécyl sulfate de sodium (SDS) peuvent avoir des effets tératogènes et mutagènes : éviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau.
» Le DAPI est un irritant. Consulter le Material Safety Data Sheet (MSDS) du produit pour les informations concernant la sécurité.

Réactif fourni

Sonde DNA-FISH prête à l'emploi : 100 µL par flacon (10 tests). Un test est défini comme suffisant pour une aire de 22mm x 22mm.

Sonde étiquetée au fluorophore pour le locus *EGFR* (rouge) et au fluorophore pour le locus centromère 7 (vert), prémélangée avec de l'ADN bloquant et un tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC et SDS).

Réactifs et matériel nécessaire mais non fournis

Equipements		Reactifs
Bocal coplin	Microtube à centrifuger (0,5 mL)	Étanol à 100%
Lamelles couvre-objets (22x22 e 25x25)	Micropipettes (1 à 200 mL)	PBS 10X
Microscope à épifluorescence	Parafilm	HCl 1N
Pinces	pH-mètre	$MgCl_2$ 1M
Hotte aspirante	Lames plus	NaOH 1M
Gants	Colle de caoutchouc	NaSCN 1M
Chambre humidifiée	Plateau pour lames	SSC 20X
Huile d'immersion	Thermomètre, calibrè (37ºC to 80ºC)	Formaline à 10%
Incubateur	Plaque chauffante	DAPI et Antifade
Lampe à mercure (100 watts)	Bain-marie	Eau distillée
Microcentrifugeuse		Pepsine
		20 Tween

Citrisolv™ est une marque enregistrée de Fisherbrand.

Préparation des réactifs

Remarque: Utiliser de l'eau distillée pour la préparation de toutes les solutions-mères et de toutes les solutions de travail.

Série d'éthanol (70%, 85% et 100%): Préparer des dilutions vol/vol d'éthanol à 100% et d'eau distillée. Conserver à TA.

HCl 0,01N (acide chlorhydrique): Ajouter 0,5 mL de HCl 1N à 49,5 mL d'eau distillée. Conserver à TA. Préchauffer la solution à 37ºC dans un bain-marie avant usage.

Solution-mère de pepsine à 0.4% (4 mg/mL): Dissoudre 100 mg de pepsine dans 25 mL de HCL 0.2N. Conserver des aliquots de 500 µL à - 20ºC.

Formaldéhyde à 1%: Ajouter 12,5 mL de formaline à 10% (4% formaldehye) à 37 mL de PBS 1X. Ajouter 500 µL de $MgCl_2$ 100X. Conserver à 4ºC jusqu'à une semaine.

SSC 0,5X(Citrate de sodium salin)/Tween 20 à 0,1%: Ajouter 25 mL de SSC 20X et 1 mL de Tween 20 à 974 mL d'eau distillée. Bien mélanger en tournoyant. Conserver à TA.

PBS 1X (solution saline dans un tampon phosphate): Mélanger 100 mL de PBS 10X et 900 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Conserver à TA.

SSC 2X: Mélanger 100 mL de SSC 20X et 900 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Conserver à température ambiante (TA).

SSC 2X/Tween 20 à 0,1%: Ajouter 100 mL de SSC 20X et 1 mL de Tween 20 à 899 mL d'eau distillée. Bien mélanger en tournoyant. Conserver à TA.

$MgCl_2$ 100X (Chlorure de magnesium) dans PBS 1X: Ajouter 50 µL de MgCl2 1M a 450 µL de PBS 1X.

Procédure pour section FFPE

Remarque: Produit prêt à l'emploi. Ne pas reconstituer ni diluer. Pour usage professionnel uniquement.

» Seul un(e) technologiste familiarisé(e) avec les méthodes de cytogénétique et formé(e) à la technique FISH peut réaliser le test. Tout l'équipement doit être étalonné avant la réalisation du test.
» Le tissu visé correspond à des sections FFPE de 4 à 5 µm d'épaisseur. Les lames doivent être préparées conformément aux directives des méthodes cytogénétiques standards du laboratoire réalisant le test.

Préparation des lames

Remarque sur la procédure: Simultanément aux coupes sériées utilisées pour l'analyse FISH, une ou des coupe(s) doivent être préparées pour coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E).

1. Les coupes pour essai FISH doivent être montées sur des lames Plus enrobées.
2. Cuire les lames sur la nuit (12 à 18 heures) à 55 °C avant l'hybridation. Utilise sous 3 jours.

Prétraitement des lames (à réaliser sous une hotte à aspiration)

1. Déparaffiner la lame dans 3 bains de CitriSolv™ de 10 min chacun, à TA.
   Remarque sur la procédure: Les bocaux de CitriSolv™peuvent être utilisés deux fois. Toutefois, le troisième bocal doit contenir du réactif encore inutilisé.
2. Déshydrater la lame en l'incubant dans deux bains d'éthanol à 100 % de 5 min chacun, à TA. Sécher à l'air (peut rester a TA pendant plusieurs heures).
   Remarque sur la procédure: La lame peut être conservée sèche à TA pendant plusieurs heures.
3. Incuber la lame dans du HCl 0,2N pendant 20 min, à TA.
4. Rincer la lame dans un bain d'eau distillée pendant 1 min à TA et 2 bains de SSC 2X de 5 min chacun, à TA.
5. Incuber la lame dans une solution de NaSCN 1M préchauffée pendant 10 min à 80°C.
   Remarque sur la procédure: Certain types de tissus, tel le tissue mammaire, nécessitent un temps d'incubation plus long (30-60 minutes).
6. Rincer la lame dans un bain d'eau distillée et 2 bains de SSC 2X de 5 min chacun, à TA.

(*Suite à la page suirante*)

Procédure pour section FFPE

7. Mettre la lame soit dans une chambre humide ou dans un Thermobrite. Couvrir la zone cible avec au moins 100 mL de pepsine 0,4%, garder la lame en cours d'incubation dans des conditions humides. Ne pas laisser l'échantillon se dessécher.
8. Incuber pendant 10 min à 37 °C.

   Remarque sur la procédure: Cette durée peut devoir être ajustée en fonction des conditions de fixation et de l'âge de la coupe.
9. Rincer la lame pendant 5 min dans de l'eau distillée, à TA.
10. Rincer la lame en deux bains de SSC 2X de 5 min chacun, à TA. Plonger brièvement dans de l'eau distillée et sécher à l'air.
11. Incuber la lame dans du formol neutre tamponné à 10 % pendant 15 min, à TA.
12. Rincer la lame en 2 changements de SSC 2X de 5 min chacun, à TA.
13. Plonger brièvement dans de l'eau distillée et sécher à l'air.

Dénaturation/hybridation de la sonde DNA-FISH

1. Vortexer la sonde DNA-FISH pendant 2 à 3 secondes et centrifuger le tube dans une microcentrifugeuse.
2. Appliquer 10 µL de sonde DNA-FISH à la zone cible sur la lame et la recouvrir d'une lamelle couvre-objet (22 x 22 mm).

   Remarque sur la procédure: Prendre soin d'éviter toute formation de bulles d'air. Des lamelles couvre-objets plus petites ou plus grandes peuvent être utilisées en fonction du changement proportionnel de volume de la sonde DNA-FISH.
3. Sceller soigneusement les bords de la lamelle couvre-objet à l'aide de colle de caoutchouc.
4. Co-dénaturer la lame et la sonde DNA-FISH pendant 5 min à 90 °C sur une plaque chauffante à température contrôlée.
5. Incuber pendant 12 à 18 heures dans une chambre humidifiée à 37 °C, à l'abri de toute lumière directe.

Lavage post-hybridation

Remarque sur la procédure: Ne pas laisser la lame sécher avant la fin des lavages.

1. 1. Retirer la colle de caoutchouc de la lame à l'aide de pinces.
2. Tremper la lame dans la solution SSC 2X à TA et retirer la lamelle couvre-objet.
3. Laver la lame pendant 2 x 5 min dans une solution de SSC 2X/Tween 20 à 0,1 % à 45°C.
4. Rincer la lame en la trempant dans de l'eau distillée.
5. Laisser sécher la lame à l'air libre à l'abri de la lumière directe.
6. Appliquer 20 µL de DAPI/antifade à la zone hybridée et recouvrir d'une lamelle couvre-objet (25 x 25 mm).

   Remarque sur la procédure: Selon la fixation, l'âge de la coupe et les conditions de prétraitement, on peut apercevoir un bruit de fond vert. Si le bruit de fond vert est excessif ou interfère avec l'attribution de score, les lames peuvent être relavées de manière plus stringente.

   Avant le relavage, retirer l'antifade en enlevant la lamelle couvre-objet et en procédant au lavage en deux changements de solution SSC 2X/Tween 20 à 0,1 % de 5 min chacun avec agitation, à TA. Procéder immédiatement au relavage, ne pas laisser la lame sécher.

   La stringence peut être accrue en ajoutant une étape de lavage de 2 x 5 min, dans une solution de SSC 0,5X/Tween 20 à 0,1 % à 45 °C. Une stringence supplémentaire peut être obtenue en augmentant la durée de lavage et/ou la température (jusqu'à 65 °C).

Accessoires pour microscope

» Objectifs

Un objectif 10X est adapté au balayage de la zone cible. Un grossissement supérieur s'avère nécessaire pour l'analyse des signaux et doit avoir lieu avec un objectif à immersion à huile 63X ou 100X.

» Huile d'immersion

L'huile d'immersion doit être adaptée à la microscopie en fluorescence.

» Lampe

Une lampe à mercure de 100 watts avec une durée de vie maximale de 200 heures est recommandée. Remplacer la lampe avant qu'elle ne dépasse les 200 heures.

» Filtres recommandés

Fluorophore	Excitation $_{max}$	Émission $_{max}$
Verte	496 nm	520 nm
Rouge	580 nm	603 nm
DAPI	360 nm	460 nm

Visualisation et interprétation des signaux

Le signal doit être visualisé à l'aide d'un microscope à epifluorescence équipé des filtres appropriés.

Remarque sur la procédure: Les signaux peuvent être à différents plans focaux, c'est pourquoi il est important de focaliser vers le haut et vers le bas des spécimens, afin de s'assurer du comptage de tous les signaux.

» Dans la métaphase diploïde normale et dans les noyaux en interphase, la sonde *EGFR* et Cen7 DNA-FISH génère deux signaux rouges et deux verts correspondant respectivement aux loci *EGFR* et Cen7 des deux chromosomes 7 normaux. La détection de tels signaux dans des cellules normales à l'intérieur du spécimen est cruciale pour un essai FISH réussi.

» Dans certaines cellules, des signaux rouges et verts adjacents peuvent se chevaucher ou fusionner pour apparaître jaunes; ceci doit être compté comme un signal rouge et un vert.

» La troncature des noyaux en coupes peut entraîner l'observation de cellules partielles comportant moins de signaux que le nombre prévu.

» Une lame colorée en H & E doit être préparée à partir d'une coupe adjacente à celles utilisées pour l'analyse FISH et la région de cancer invasif doit être déterminée par un pathologiste qualifié. Seuls les noyaux de tumeurs doivent recevoir un score – ne pas donner de score aux cellules inflammatoires, aux cellules musculaires, aux fibroblastes ou autres cellules stromales.

» Des régions invasives discontinues peuvent être identifiées par le pathologiste et celles-ci peuvent toutes recevoir des scores et être combinées dans l'analyse. Dans les cellules avec amplification du gène, le nombre de signaux rouges (*EGFR*) est augmenté par rapport au nombre de signaux verts témoins (Cen7).

» Dans certains types de tumeurs, les cellules avec forte polysomie de chromosome 7 (par ex.: nombre accru de copies des signaux *EGFR* et Cen7) peuvent aussi être comptées comme amplifiées pour l'*EGFR*.[6] L'amplification peut aussi être observée comme un groupement de signaux *EGFR* (rouges) correspondant à ≥ 4 signaux en luminosité.[6]

Recommendations and limitations

» Les informations tirées de l'analyse FISH doivent être interprétés dans la totalité du contexte des antécédents cliniques du patient. Aucune décision médicale ne peut être prise en se fondant uniquement sur les résultats de l'essai FISH.

» Ce produit a été optimisé pour être utilisé sur des lames préparées à partir de spécimens de tissu FFPE. Le fabricant assure que ce produit répond aux caractéristiques de performance analytique (sensibilité, spécificité, reproductibilité et intervalle de validité) établies sur le tissu prévu.

» Les cellules normales à l'intérieur du spécimen doivent être utilisées comme témoin interne de l'essai FISH. Il incombe au laboratoire d'établir les intervalles de validité à l'aide de spécimens de contrôle positifs et négatifs du tissu prévu.

» L'utilisation de filtres aux caractéristiques spectrales autres que celles spécifiées peut affecter négativement la force du signal. Par exemple, le fluorophore rouge est visible à travers un filtre orange, mais les signaux apparaissent faibles.

(*Suite à la page suirante*)

Glossaire des symboles

LOT Numéro de lot
Risques biologiques
REF Numéro de catalogue
Attention, consulter la documentation d'accompagnement
CE Marquage CE de conformité
Contient suffisamment pour 10 tests
IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
Conserver à l'abri de la lumière du soleil
Fabricant
Limite supérieure de température
Utiliser avant le



Cancer Genetics Italia S.r.l.
Viale Luigi Majno, 17
20122 Milano - Italia
www.cancergeneticsitalia.com
support@cancergeneticsitalia.com

DNA-FISH Probe fabriquée dans la communanté européenne par Cancer Genetics Italia S.r.l.

Bibliographie

1. Toschi, L. et al. The Oncologist, 2007. 12:221-220.
2. Bhargava, R., et al. Modern Patholy, 2005. 18: 1027-1033.
3. Hirsch, F., et al. J Clin Oncol, 2008. 26:3351-3357.
4. Personeni, N., et al. Clin Cancer Res, 2008. 14(18):5869-5876.
5. Zimmermann, R., et al. Radiation Oncology, 2006. 1:11.
6. Varella-Garcia, M., et al. J Clin Pathol, 2009. 62:970-977.